Anreicherung einer spezifischen Pterindesaminase

(2-Amino-4-hydroxy-pteridin-Aminohydrolase) aus Rattenlebern

FRANZ SIMMERSBACH

1967

Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie, München
(Direktor: Professor Dr. A. Butenandt)

Anreicherung einer spezifischen Pterindesaminase

(2-Amino-4-hydroxy-pteridin-Aminohydrolase)

aus Rattenlebern

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Franz Simmersbach
aus
Erfurt

1967
München

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Referent: Privatdozent Dr. H. Rembold
2. Referent: Professor Dr. A. Butenandt

Tag der mündlichen Prüfung: 26.7.1967

Foto-Druck Frank, 8 München 13, Zieblandstraße 39, Telefon 597397,

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie in München unter Leitung von Herrn Privatdozent Dr. H. Rembold angefertigt.

Herrn Professor Dr. A. Butenandt danke ich sehr herzlich für die großzügige und wohlwollende Förderung dieser Arbeit.

Herrn Dr. H. Rembold bin ich für seine zahlreichen Anregungen, seine wertvollen Ratschläge und sein ständiges Interesse, das er der Arbeit entgegenbrachte, sehr dankbar.

Meinem im Krieg gefallenen Vater.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung und Problemstellung	1
2. Nachweis einer Pterindesaminase in der Honigbiene	2
.1 Der enzymatische Test	2
.2 Desaminaseaktivität in verschiedenen Entwicklungsstadien	3
.3 Das Guanaseproblem	4
.4 Trennung von Guanase und Pterindesaminase	5
3. Rattenversuche	5
.01 Vorversuche	6
.02 Charakterisierung des Metaboliten	7
.03 Zellfraktionierung	9
.04 Abtrennung der Xanthinoxydase	10
.05 Ammoniumsulfatfraktionierung	10
.06 Der enzymatische Test	12
.07 Versuche zur Anreicherung der Pterindesaminase	17
.08 Stabilität und Eigenschaften eines 23fach angereicherten Enzyms	20
.09 Einfluß von Zusätzen auf den Umsatz	25
.10 Zur Reversibilität der Reaktion	26
.11 Hemmversuche	26
.12 Substratspezifität	27
.13 Kriterien für die Existenz einer Pterindesaminase	28
4. Diskussion	30
5. Zusammenfassung	34
6. Experimenteller Teil	35
Literaturverzeichnis	42

1. Einleitung und Problemstellung

1959 berichteten Levenberg und Hayaishi (1) über die Anreicherung einer relativ unspezifischen Pterindesaminase aus Alcaligenes metalcaligenes. Ein ähnliches Enzym konnte McNutt (2) in Alcaligenes faecalis nachweisen. Diese Enzyme katalysieren die Umwandlung verschiedener Pterinderivate in die lumazinanalogen Verbindungen. Ein solcher Übergang aus der Pterin- in die Lumazinreihe ist im Rahmen der von Rembold und Mitarbeitern durchgeführten Untersuchungen über die biologische Funktion des Biopterins aus zwei Gründen von besonderem Interesse. Die Honigbiene enthält nur Biopterin und Violapterin(7-Hydroxylumazin) in größerer Menge; Violapterin kommt in der Flugbiene in fast doppelt so hoher Konzentration vor wie in der Puppe (3). Tetrahydrobiopterin wird durch Rattenleberhomogenat zum Teil in 6-Hydroxylumazin umgewandelt (4). In beiden Fällen ist mit dem Vorkommen einer mehr oder weniger spezifischen Pterindesaminase zu rechnen, welcher auch regulatorische Aufgaben zur Kontrolle der Tetrahydrobiopterin-Konzentration im Organismus zukommen können. Die Vorstellungen über die Biosynthese der Pterine und Lumazine sind noch nicht vollständig bewiesen. Brown (5) zeigte, daß zellfreie Extrakte aus Escherichia coli Purine als Vorstufe für die Folsäurebiosynthese verwenden. Ebenso konnte Weygand (6) im Kohlweißling die Bildung von Leucopterin aus einem Purin beweisen. Die Arbeiten von Plaut (7), Goodwin (8) und Masuda (9) über die Biosynthese des Riboflavins liefern einen weiteren Hinweis auf den Übergang von Purinen in Pteridine und Flavine. Forrest (10) bzw. Hayaishi (1) diskutieren als weitere Möglichkeit eine Biosynthese der Pterine aus Lumazinen. Für einen solchen Übergang könnte eine Pterindesaminase verantwortlich sein, welcher in Organismen, die eine eigene Synthese der Vitamine Folsäure und Riboflavin durchführen, eine große biologische Bedeutung zukommen würde.

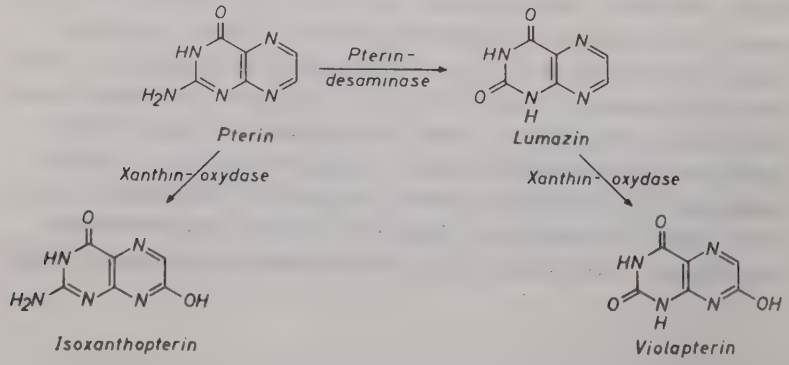
Mit der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode entwickelt, um in Bienen und Ratten eine spezifische Pterindesaminase nachzuweisen, sie anzureichern und zu charakterisieren.

2. Nachweis einer Pterindesaminase in der Honigbiene

2.1 Der enzymatische Test

Eine wichtige Voraussetzung zum Nachweis und für die Reinigung von Enzymen ist eine Testmethode, die in kurzer Zeit gut reproduzierbare Ergebnisse garantiert. Es mußte daher zuerst ein Test aufgebaut werden, der diese Forderungen weitgehend erfüllt.

Als Substrat bietet sich 2-Amino-4-hydroxypteridin(Pterin) an, das leicht durch Kondensation von 2,4,5-Triamino-6-hydroxy-pyrimidin mit Glyoxal hergestellt werden kann (11). Mit der Synthese dieses einfachen Pteridinderivates entfallen die großen Schwierigkeiten einer Isomerentrennung (12). Bei der enzymatischen Abwandlung durch Homogenat sind als Reaktionsprodukte Isoxanthopterin, das bei der Oxydation des Ausgangsmaterials durch Xanthinoxydase entsteht, sowie Violapterin zu erwarten, das aus Lumazin, dem Desaminierungsprodukt des Pterins, ebenfalls durch Xanthinoxydase gebildet wird.



Eine optische Methode zum Nachweis der gesuchten enzymatischen Reaktion erscheint wenig aussichtsreich, da die große Ähnlichkeit der UV-Spektren von Isoxanthopterin (13) und Violapterin (14) nur zu kleinen Extinktionsunterschieden führt, besonders dann, wenn geringe Umsätze zu messen sind. Auch wenn in einem späteren Reinigungsstadium die Xanthinoxydase entfernt ist und nur Pterin und Lumazin im Reaktionsansatz zu erwarten sind, muß aus den selben Gründen auf einen optischen Test verzichtet werden.

Um minimale enzymatische Umsätze messen zu können, wurde Pterin in Stellung 2 mit Kohlenstoff-14 radioaktiv markiert. Auf Ionenaustauschern lassen sich die oben erwähnten Umwandlungsprodukte leicht trennen. Isoxanthopterin wird aus einer Ecteola-Cellulosesäule schon mit Wasser eluiert, Violapterin dagegen festgehalten. Es kann mit verdünnter Ameisensäure einfach abgetrennt und in seiner Radioaktivität bestimmt werden. Eine quantitative Trennung des Pterins von Lumazin bereitet dagegen Schwierigkeiten. Sie lassen sich umgehen, wenn man den denaturierten Testansatz mit Xanthinoxydase nachinkubiert und dann Isoxanthopterin von Violapterin trennt. Für die Inkubation wurde 0,1m Citrat-Phosphatpuffer, pH 6,5 verwendet.

2.2 Desaminaseaktivität in verschiedenen Entwicklungsstadien

Die Gesamthomogenate zeigen in allen Stadien der Imaginalentwicklung eine meßbare Desaminaseaktivität (Abb. 1). Dabei findet sich die größte in 4-tägigen Larven, die als Ausgangsmaterial für weitere Versuche verwendet werden. Keine meßbare Aktivität findet sich in der geschlüpften Imago. Bei den Kontrollansätzen, in denen das Protein vor der Inkubation durch Aufkochen denaturiert wurde, wird, wie gefordert, kein Umsatz gemessen.

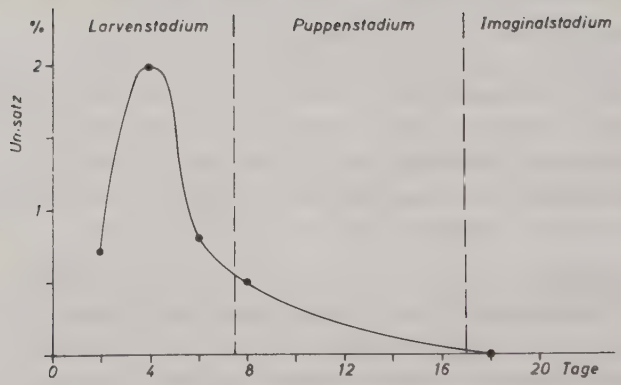


Abb. 1 Abhängigkeit der Pterindesaminase-Aktivität vom Entwicklungsstadium der Honigbiene. Ansatz: 10 ml Citrat-Phosphatpuffer, pH 6,5, 150 γ (2-^{14}C)Pterin, Inkubationsdauer 1 Stunde bei 37°C, je Ansatz 200 mg Protein.

2.3 Das Guanaseproblem

Der gefundene geringe Umsatz ist ein erster Hinweis auf das Vorkommen von Pterindesaminase. Es ist aber noch auszuschließen, daß der gemessene Umsatz der bekannten Guanase zuzuschreiben ist. Guanin und Pterin haben am Pyrimidinring die gleichen Substituenten, beide unterscheiden sich nur im Ring 2, der beim Pterin um ein C-Atom erweitert ist. Trotz der bekanntermaßen hohen Spezifität der Guanase könnte dieses Enzym Pterin in geringer Menge desaminieren, da die enzymatische Reaktion am in beiden Molekülen gleich aufgebauten Pyrimidinkern stattfindet. Aus diesen Gründen wurde eine Ammoniumsulfatfällung eines Homogenats durchgeführt, um beide Enzymaktivitäten zu trennen.

2.4 Trennung von Guanase und Pterindesaminase

Tabelle 1 zeigt das Ergebnis der Ammoniumsulfatfällung. Der Testansatz wird nach der Inkubation mit Xanthinoxydase nachinkubiert, die Guanase nach der Methode von Kalkar (15) bestimmt.

Tabelle 1 Bestimmung von Guanase und Pterindesaminase nach Ammoniumsulfat-Fraktionierung eines Homogenats viertägiger Bienenlarven.

Konzentration $AmSO_4$ in %	Proteingehalt mg/ml	Summe Protein in mg	Guanaseeinheiten/ mg/Min.	Pterindesaminase Umsatz/ 100 mg Prot.
30	13,2	106	0	0,8 %
50	25,6	205	nicht gemessen	0
70	22,4	179	2,5	0,18 %
100	4,7	38	nicht gemessen	0

Wie aus der Tabelle zu ersehen ist, werden Guanase und Pterindesaminase bei der Fraktionierung voneinander getrennt. Die Desaminierung des Pterins wird somit in Bienenlarven durch ein Enzym katalysiert, das nicht mit Guanase identisch ist.

3. Rattenversuche

Die Honigbiene enthält also ein Enzym, welches die Umwandlung von Pterin in Lumazin katalysiert. Seine Aktivität ist allerdings sehr gering, und für eine Anreicherung des Enzyms aus Larven wären große Tiermengen notwendig. Die Arbeiten von Metzger (4), der bei der Inkubation von hydrier-

tem Biopterin mit Rattenleberhomogenaten in großer Ausbeute 6-Hydroxylumazin fand, legten es nahe, für eine Anreicherung und Reinigung des Enzyms Rattenleber als Ausgangsmaterial zu verwenden. Um möglichst viel Lebermaterial aus einer Ratte zu erhalten, wurden 3-4 Monate alte Tiere verwendet, in denen die spezifische Enzymaktivität ebenso groß ist, wie bei jungen Tieren.

3.01 Vorversuche

Zunächst wurden Homogenate von frischen Rattenlebern auf das Vorkommen einer Pterindesaminaseaktivität geprüft. Für diese Experimente wurde die Testmethode der Bienenversuche übernommen. Die Abbildungen 2a und 2b beweisen, daß Pterin teilweise in einen Stoff umgewandelt wird, der von einer Ecteola-Cellulosesäule mit 1%iger Ameisensäure eluiert werden kann. Im Kontrollansatz wird dieser Stoff nicht gebildet. Eine anschließende Chromatographie der wässrigen Zone auf Phosphorcellulose zeigt, daß nicht umgesetztes Pterin in Isoxanthopterin umgewandelt wird, während im Kontrollansatz das Substrat wieder unverändert isoliert wird.

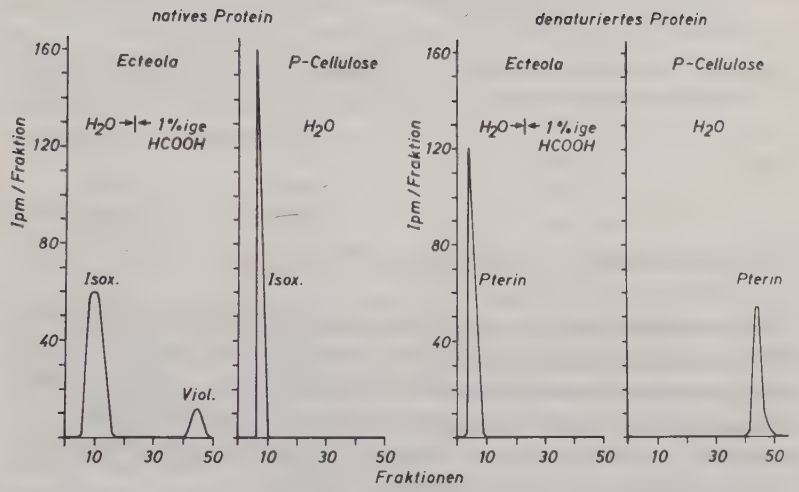


Abb. 2a (links) Auswertung eines Inkubationsansatzes durch Chromatographie über Ecteola und P-Cellulose. Ansatz: 6 ml, 0,1m Citrat-Phosphatpuffer, pH 6,5, 250 γ (2-^{14}C)Pterin, 1 g Leber, Inkubationsdauer 3 Stunden bei 37°C, Stoppen der Reaktion durch Aufkochen.

Abb. 2b (rechts) Kontrollansatz. Vor der Inkubation kräftiges Aufkochen des Ansatzes, Bedingungen sonst wie oben.

3.02 Charakterisierung des Metaboliten

Zur Charakterisierung der im nativen Ansatz entstandenen sauren Substanz (Frkt.Nr. 40-50) wurde der Stoff durch Gradientenelution über eine Ecteolasäule, anschließend durch präparative Papierchromatographie in System c und eine zweite Chromatographie über eine Ecteolasäule gereinigt.

Tabelle 2 Papierchromatographischer Vergleich der sauren Substanz mit Violapterin. Zu den Laufmitteln vergl. Kapitel 6.

System	Saure Substanz	Mischfleck	Violapterin
a	0,16	0,16	0,14
b	0,37	0,37	0,40
c	0,30	0,30	0,31
d	0,27	0,27	0,25

Der Vergleich der R_f-Werte des gereinigten Metaboliten mit synthetischem Violapterin und mit Mischflecken beider Stoffe zeigt, daß der unbekannte Stoffmit Violapterin identisch ist. Dieses Ergebnis wird durch einen Vergleich der UV-Spektren gesichert. Die UV-Maxima zeigen für den Metaboliten die gleichen Werte wie für das Violapterin (Abb. 3).

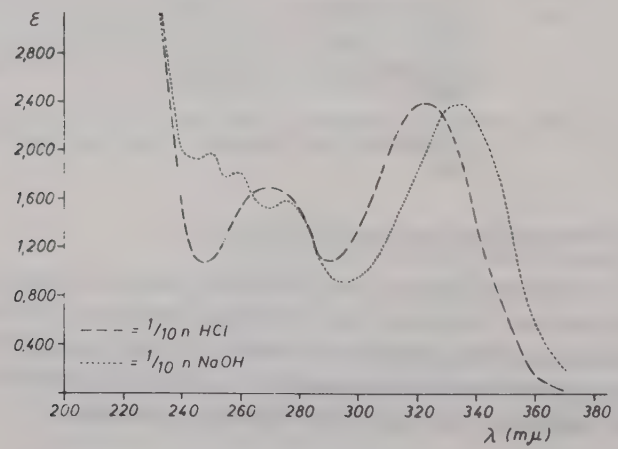


Abb. 3 UV-Spektren des sauren Metaboliten, gemessen in 0,1 n HCl (-----) und 0,1 n NaOH (.....). λ max (mμ): 0,1 n HCl 270,323; 0,1 n NaOH 249,258,275, 334.

Damit ist der saure Metabolit eindeutig als Violapterin identifiziert. Eine quantitative Betrachtung des Umsatzes im Rattenleberhomogenat ergibt eine 5-8fach höhere enzymatische Aktivität als in Bienenlarven. Ratten sind also nach diesem Ergebnis ein besser geeigneter Organismus zum Studium der Pterindesaminase.

3.03 Zellfraktionierung

Die nächsten Experimente sollen klären, in welchen Zellpartikeln das Enzym lokalisiert ist. Dazu wurden Rattenlebern in 0,35 m Sucroselösung homogenisiert und fraktioniert zentrifugiert. Der Überstand aus der Mikrosomenfraktion wurde mit Sephadex G-25 konzentriert und das erhaltene Konzentrat für den Inkubationsansatz verwendet. Die gewaschenen, rezentrifugierten Partikel wurden in dem für die Inkubation verwendeten Puffer homogenisiert und so für die Ansätze vorbereitet.

Tabelle 3 Beteiligung der Zellbestandteile an der Bildung von Violapterin. Ansatz: 1 g Frischgewicht der Zellpartikel, 0,1 m Citrat-Phosphatpuffer, pH 6,3, 1 Stunde bei 37°C inkubiert, 100 γ (2-^{14}C)Pterin, nachinkubiert mit 0,1 mg XOD (nicht bei Cytoplasma und Homogenat), (XOD = Xanthinoxydase).

Kernfraktion (und nicht aufgeschlossene Zellen)	5,0 % Umsatz
Mitochondrien	0,3 %
Mikrosomen	0,3 %
Cytoplasma	4,5 %
Homogenat	9 - 11 %

Die hohe Umsatzrate der 1. Fraktion (Tab. 3) geht darauf zurück, daß beim Homogenisieren in 0,35 m Sucroselösung nicht alle Zellen aufgeschlossen werden. Das für die Pterindesami-

nierung verantwortliche Enzym befindet sich im Cytoplasma. Für die weiteren Versuche wurde deshalb der Überstand eines bei 23 000xg zentrifugierten Homogenats verwendet.

3.04 Abtrennung der Xanthinoxydase

Pterin und sein Desaminierungsprodukt Lumazin sind gute Substrate für die Xanthinoxydase. Die Oxydation dieser Stoffe zu Isoxanthopterin bzw. Violapterin verläuft so schnell, daß für die langsamere Desaminierung nicht genügend Substrat zur Verfügung steht. Ein Ausweg wäre die Verwendung von Isoxanthopterin als Substrat. Dieses wird durch die Desaminase ebenfalls zu Violapterin umgesetzt, wie Papierchromatogramme zeigen, aber die Ausbeute ist nur halb so groß wie beim Pterin. Eine eingehendere Untersuchung der Pterindesaminase erfordert das Ausschalten der konkurrierenden Reaktionen. Xanthinoxydase wird durch Borat oder 6-Pteridylaldehyd gehemmt; wie aber aus Arbeiten von Doisy (16), Kalkar (17) und Roush (18) bekannt ist, ist diese Hemmung nicht vollständig. Eine genaue Berechnung der spezifischen Aktivität der Pterindesaminase kann deshalb bei den Reinigungsschritten erst nach Abtrennung der Xanthinoxydase erfolgen.

3.05 Ammoniumsulfatfraktionierung

Der Überstand des Leberhomogenats wurde mit fünf Ammoniumsulfatkonzentrationen behandelt und in jeder Fraktion die spezifische Guanase- und Pterindesaminaseaktivität bestimmt. Das Vorkommen von Xanthinoxydase in einer Fraktion läßt sich leicht feststellen, da bei Verwendung von Pterin als Substrat die hellblaue Fluoreszenz in wenigen Minuten verschwindet und die intensiv violette Isoxanthopterinfluoreszenz entsteht.

Tabelle 4 Ammoniumsulfatfraktionierung des 23 000×g-Überstandes aus Rattenleberhomogenat. Ansatz: 13 ml 0,1 m Citrat-Phosphatpuffer, pH 6,4, 60 mg Protein, 100 γ (2-^{14}C)Pterin, 45 Minuten bei 37°C inkubiert, nachinkubiert mit 0,1 mg XOD 30 Minuten.

Sättigung $AmSO_4$ in %	Ausbeute an Violapterin (%)	Guanaseeinheiten/mg Protein/Min.	Xanthinoxydase
30	0	0	-
50	2,0	0	+
60	14,0	1,6	-
70	6,0	nicht gemessen	-
90	3,0	nicht gemessen	-

Xanthinoxydase läßt sich durch Ammoniumsulfatfällung von der Pterindesaminase abtrennen (Tab. 4). Guanase fällt, wie nach Shuster (19) zu erwarten ist, bei 60%iger Ammoniumsulfatsättigung. Die Pterindesaminase fällt auch in diese Fraktion. Die konkurrierende Reaktion der Xanthinoxydase ist ausgeschaltet. Jetzt kann die von einem Enzym zu fordernde lineare Abhängigkeit des Umsatzes von der Proteinmenge gezeigt und damit ein weiterer Beweis für eine echte enzymatische Reaktion erbracht werden (Abb. 4).

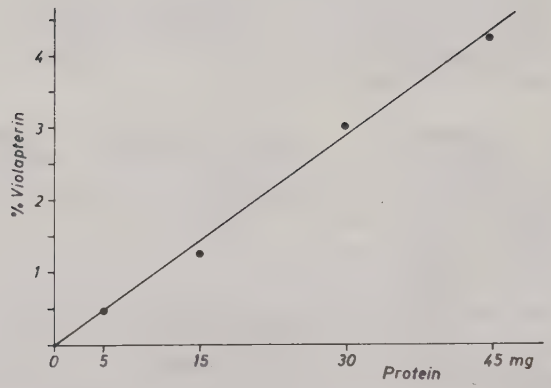


Abb. 4 Abhängigkeit der Pterindesaminaseaktivität von der Proteinmenge. Ansatz: 6,5 ml 0,1 m Citrat-Phosphatpuffer, Protein (Fraktion 60 % $(NH_4)_2SO_4$), pH 6,4, 280 γ (2-^{14}C)Pterin, 7 Minuten bei 37°C inkubiert, nachinkubiert mit 0,1 mg XOD, 30 Minuten.

3.06 Der enzymatische Test

Im Gegensatz zu den Versuchen mit Bienenlarven fällt bei Verwendung von Rattenlebern die Pterindesaminase zusammen mit der Guanase bei 60 % Ammoniumsulfatsättigung. Beide Enzyme scheinen also sehr ähnlich, wenn nicht identisch zu sein. Gegen eine Identität spricht allerdings neben den Bienenversuchen auch die Untersuchung einer Guanasepräparation aus Kaninchenleber (Boehringer). Sie zeigte selbst nach 3 Stunden Inkubation weder mit Pterin noch mit Isoxanthopterin einen Umsatz. Ebenso ließ sich bei der Untersuchung eines Extraktes aus Hühnerleber wohl Guanase-, aber keine Pterindesaminaseaktivität feststellen.

Es ist anzunehmen, daß die Trennung beider Enzyme im vorliegenden Falle sehr schwierig sein wird. Daher muß ein optimaler Test gefunden werden, mit dem auch geringe Unterschiede

in der Aktivität von Guanase und Pterindesaminase gemessen werden können. Der Aufbau eines Tests wurde mit den folgenden Versuchen unternommen. Als Enzymquelle wurde das mit 60 % Ammoniumsulfatsättigung gefällte Protein, in 0,1 m Citrat-Phosphatpuffer gelöst, verwendet.

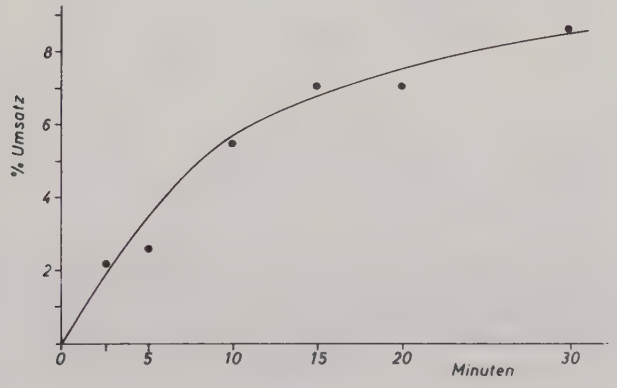


Abb. 5 Abhängigkeit des Umsatzes von der Zeit. Ansatz: 60 mg Protein (Fraktion 60 % $(NH_4)_2SO_4$) in 5 ml 0,1 m Citrat-Phosphatpuffer, pH 6,4, 50 γ (2-^{14}C)Pterin, Temperatur 37°C, nachinkubiert mit 0,1 mg XOD, 30 Minuten.

Bei der Änderung der Inkubationszeit (Abb. 5) geht der lineare Anstieg nach 10 Minuten in eine flache Sättigungskurve über. Aus der Kurve wurde als günstigster Wert für die Testmethode 7 Minuten Inkubationsdauer ermittelt. In diesem Zeitraum ist die geforderte Linearität noch vorhanden und die Ausbeute an Violapterin noch gut meßbar.

Den Einfluß des pH-Wertes auf die Reaktion gibt Bild 6 wieder. Es wurden zwei sich überschneidende Puffer gewählt, die über einen großen Teil der pH-Skala puffern. Für die sauren pH-Werte wurde Citrat-Phosphatpuffer gewählt, für

den alkalischen Bereich Tris-Acetatpuffer, in dem auch von Mansor (20) das pH-Maximum der Rattenleberguanase bestimmt wurde.

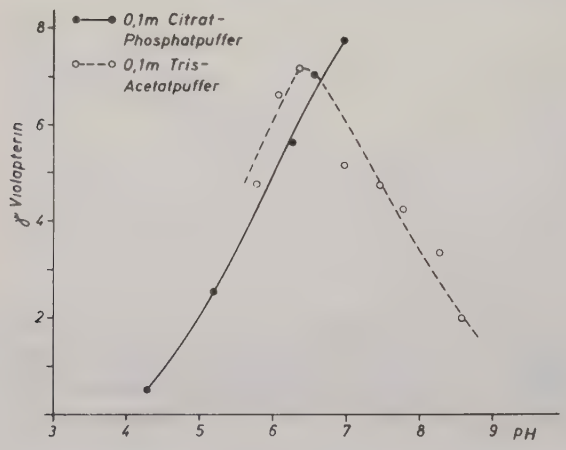


Abb. 6 Abhängigkeit der Pterindesaminaseaktivität vom pH-Wert. Ansatz: 33 mg Protein (Fraktion 60 % $(NH_4)_2SO_4$), 5 ml Puffer, 280 γ (2-^{14}C)Pterin, 7 Minuten bei 37°C inkubiert, nachinkubiert mit 0,1 mg XOD, 30 Minuten.
Citrat-Phosphatpuffer 0,1 m (——)
Tris-Acetatpuffer 0,1 m (.....)

Bei pH 6,5 zeigt sich ein Maximum des Umsatzes. Dieses Maximum der Desaminierung liegt um 2,5 pH-Einheiten weiter im Sauren als das der Guanase.

Zur Bestimmung der Substratsättigung wurden zu den Ansätzen bei konstantem Proteingehalt steigende Substratmengen zugegeben.

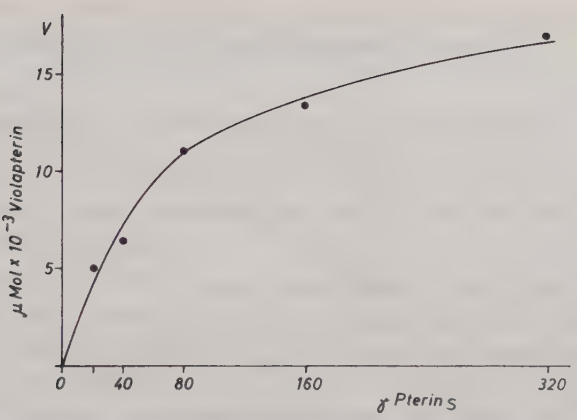


Abb. 7 Abhängigkeit der Pterindesaminaseaktivität von der Substratkonzentration. Ansatz: 60 mg Protein (Fraktion 60 % $(NH_4)_2SO_4$), 4 ml Citrat-Phosphatpuffer 0,1 m, pH 6,4, 7 Minuten bei 37°C inkubiert, nachinkubiert mit 0,1 mg XOD.

Die Sättigung des Enzyms ist mit ca. 200 γ Pterin erreicht. Auf eine 3fach höhere Substratzugabe mußte wegen der schlechten Löslichkeit von Pterin im Sauren bei den weiteren Versuchen verzichtet werden.

Mit den Werten aus Abbildung 7 läßt sich die Michaeliskonstante K_m für die Pterindesaminase berechnen.

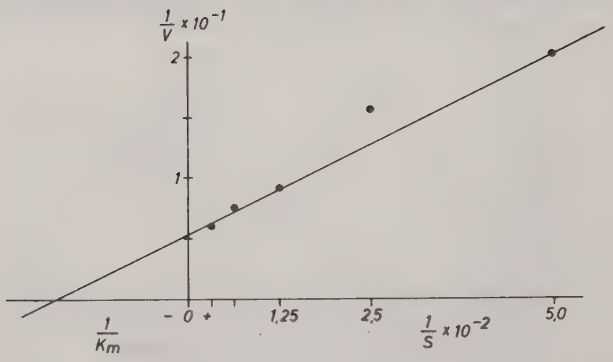


Abb. 8 Bestimmung des K_m-Wertes nach Lineweaver-Burk.

Nach dem bekannten Lineweaver-Burk-Verfahren (21) ergibt sich ein K_m-Wert von 3×10^{-5} m .

Aus den obigen Versuchen lassen sich die optimalen Testbedingungen für das Studium der Pterindesaminierung festlegen. Wenn nicht ausdrücklich erwähnt wird, ist der Ansatz für alle weiteren Versuche wie folgt:

4 ml 0,1 m Citrat-Phosphatpuffer, pH 6,5,
230 γ (2-^{14}C)Pterin, ca. 10^5 Ipm,
Inkubationsdauer 7 Minuten,
Temperatur 37°C,
Stoppen der Reaktion durch Aufkochen,
30 Minuten Nachinkubation mit 0,05 mg XOD.

Eine Ursache für Schwankungen in der Ausbeute ist die Art des Abbruchs der Reaktion. Die übliche Fällung mit TCE kann wegen der anschließenden Chromatographie nicht angewendet werden. Der Ansatz wird nach Abzentrifugieren des denaturierten Proteins auf kleinen Ecteola-Saulen (5 ml) chromato-

graphisch weiterverarbeitet. Eine genaue Beschreibung der Elution befindet sich im experimentellen Teil.

3.07 Versuche zur Anreicherung der Pterindesaminase

Der oben ausgearbeitete Test erlaubt eine weitere Reinigung und weitere Versuche, die Guanase von der Pterindesaminase zu trennen.

Eine Reinigung des Enzyms wurde durch Alkoholfällung, Acetonfällung, Adsorbtion an Ca-Phosphatgel sowie Adsorbtion an Al-C_γ-Gel versucht. Keine dieser Methoden führte zu einem befriedigenden Ergebnis. Die Ausbeuten an Protein und die jeweilig erhaltene spezifische Aktivität der Präparationen waren so gering, daß eine Anreicherung auf einem dieser Wege unter den gewählten Bedingungen nicht empfehlenswert war. Auffallend war aber bei allen Versuchen, daß das Verhältnis von Guanaseaktivität zu Pterindesaminaseaktivität nie konstant blieb. Eine solche Konstanz wäre zu erwarten, wenn die Guanase mit der Pterindesaminase identisch ist. Bei Chromatographie der Proteinfraktion über DEAE-Cellulose oder DEAE-Sephadex wurden beide Enzyme weitgehend inaktiviert. Selbst die sonst ohne Schwierigkeit nachweisbare Guanase wurde nur noch mit wesentlich geringerer spezifischer Aktivität gefunden. Die Pterindesaminase war gerade noch nachweisbar. Somit schied auch diese bei der Reinigung von Enzymen sonst erfolgreich verwendete Methode aus. Kleine Umsätze bei nicht sorgfältig aufgekochten Kontrollversuchen sprachen dafür, daß eine Hitzebehandlung als Schritt zur Reinigung des Enzyms geeignet sein könnte. Als günstigste Temperatur wurden 60°C bei einer Zeitdauer von 5 Minuten ermittelt. Wichtig ist, daß die Proteinlösung vorher über Nacht gegen 0,001 m Citrat-Phosphatpuffer dialysiert wird, da noch vorhandene Ionen die Anreicherung stören.

Die Anwendung dieser Methode führt zu einer Steigerung der spezifischen Aktivität um das 2-3fache. 60 % des eingesetzten Proteins werden entfernt bei einer Ausbeute von über 90 % Enzymeinheiten. Der Gehalt an Guanase wird bei diesem Anreicherungsschritt ebenfalls um den gleichen Betrag erhöht.

Bei den oben geschilderten, nicht erfolgreichen Trennungsmethoden für Guanase und Pterindesaminase war eine Reinigung auf Grund verschiedener Ladungen der Proteine zu erwarten. Weitere Versuche beschäftigen sich mit der Möglichkeit, die beiden Enzyme auf Sephadex G-100 unter Verwendung einer Recychrom-Apparatur auf Grund eventueller Größenunterschiede ihrer Moleküle zu trennen. Diese Apparatur erlaubt es, umlaufend zu chromatographieren und ohne Unterbrechung der Chromatographie Fraktionen aus der Säule zu entnehmen. Als Vorversuch wurde das nach einer Ammoniumsulfatfällung hitzebehandelte Protein aus drei Rattenlebern auf einer Säule mit 740 ml Gelbett aufgetragen. Das Sephadexgel war mit 0,01 m Citrat-Phosphatpuffer in die Säule eingeschlämmt. Die Proteinzone wurde dreimal umlaufen gelassen. Als Elutionsmittel diente der oben angegebene Puffer. Die Fraktionen wurden mit einem Fraktionssammler aufgefangen und in diesen der Proteingehalt bestimmt. Danach wurde die Guanase- bzw. Pterindesaminaseaktivität im Chromatogramm getestet. Das Ergebnis zeigt das Bild 9.

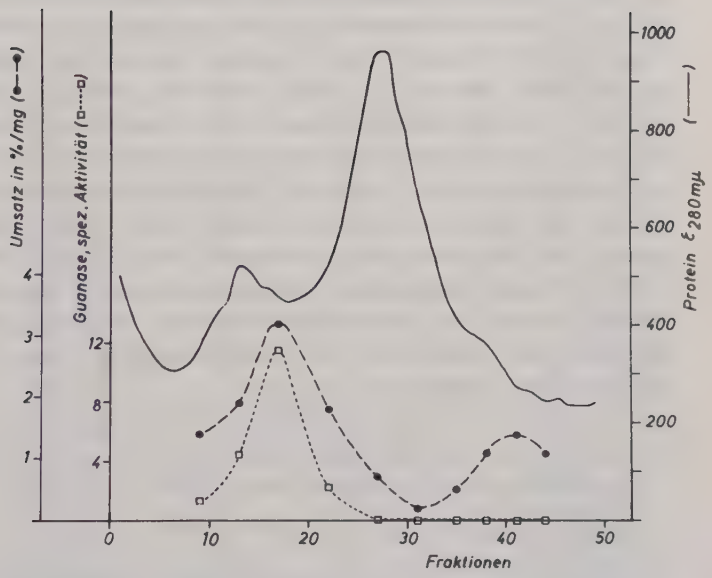


Abb. 9 Trennung von 125 mg Protein (nach Hitzeschritt, 5 Minuten, 60°C) nach dreimaligem Umlauf. Guanase (·····), Pterindesaminase (----), Protein (———).

An einen großen Pterindesaminasegipfel, unter dem dazu symmetrisch die Guanase liegt, schließt sich ein kleinerer Desaminasegipfel an. Dessen Aktivität ist ungefähr halb so groß, enthält aber im Gegensatz zum ersten Gipfel keine Guanase. Das Verhältnis von Guanase zu Pterindesaminase ist im vorderen Gipfel nicht konstant. Bei Wiederholung des Versuches, aber nur einmaligem Durchlaufen der Säule, konnte wieder nach dem großen Aktivitätsgipfel eine kleinere Zone mit Pterindesaminaseaktivität eluiert werden, in der keine Guanase nachweisbar war. Die Proteinmengenunter dem zweiten Gipfel sind sehr gering.

Damit schien das Problem der Trennung von Guanase und Pterindesaminase gelöst. Bei der Übertragung der Vorversuche auf einen Großansatz mit 30 Rattenlebern konnte aber die erhoffte Trennung nicht erzielt werden. Nach dem ersten hohen Aktivitätsgipfel wurde kein einheitlicher zweiter Aktivitätsbereich abgetrennt, obwohl nach der großen Fraktion immer geringe Pterindesaminaseaktivitäten nachweisbar blieben. Auch mit wiederholten Großansätzen konnte das Ergebnis der Vorversuche nicht wieder erzielt werden. Da eine Trennung von Guanase und Pterindesaminase nicht gelungen war, mußten möglichst viele Kriterien erbracht werden, die eine Verschiedenheit der beiden Enzyme zeigen. Dabei wurde auf hohe Anreicherung der Desaminase weniger Wert gelegt.

3.08 Stabilität und Eigenschaften eines 23fach angereicherten Enzyms.

In Tabelle 5 ist das Ergebnis einer Großaufarbeitung zusammengestellt.

Mit der Berechnung der Anreicherung kann erst nach der Abtrennung der Xanthinoxydase begonnen werden. Als Rohsaft wird deshalb der Überstand nach einer 50 % Ammoniumsulfatfällung bezeichnet.

Tabelle 5 Anreicherung von Guanase und Pterindesaminase aus 50 Rattenlebern. Eine Guanaseeinheit ist die Menge Protein, die in der Minute die Extinktion bei 290 mμ um 0,005 verändert. 1 Pterindesaminaseeinheit ist die Proteinmenge, die in 7 Minuten bei 37°C 0,1 x 10^{-3} μMol Lumazin gebildet hat.

A	B	C	D	E	F	G	H	I	K
Rohsaft	66000	4,5	100	1	67200	4,6	100	1	1
$AmSO_4$, 60 %	63000	16,0	96	3,6	29400	7,4	44	1,6	2,2
Hitze	62000	43,0	94	9,5	26400	18,2	39	4	2,4
Sephadex I	42000	108	62	24,0	15000	39,8	22	8,6	2,8
Sephadex II	17000	172	25	38,0	10200	106	15	23	1,6

A = Aufarbeitungsschritt, B = Summe der Guanaseeinheiten, C = Spezifische Aktivität der Guanase, Einheiten/mg Protein, D = Ausbeute an Guanaseeinheiten, E = Anreicherung der Guanase, F = Summe der Pterindesaminaseeinheiten, G = Spezifische Aktivität der Pterindesaminase, Einheiten/mg Protein, H = Ausbeute an Pterindesaminaseeinheiten, I = Anreicherung der Pterindesaminase, K = Verhältnis der Guanaseaktivität zur Pterindesaminaseaktivität.

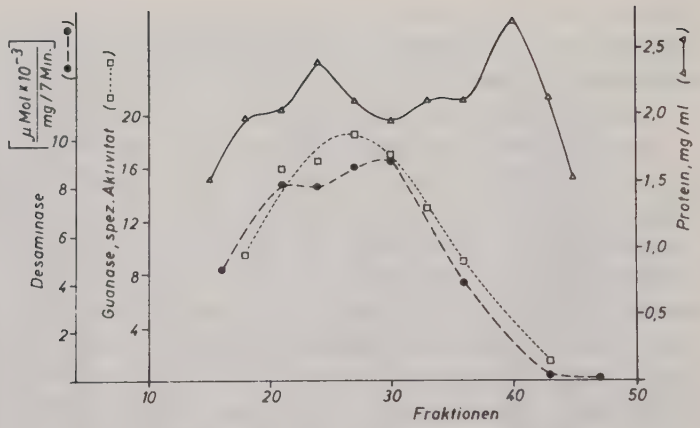


Abb. 10 Zweite Chromatographie von 380 mg Protein (aus 1. Sephadexchromatographie) auf Sephadex G-100, dreifacher Umlauf. Guanase (·····), Pterindesaminase (· – – –), Protein (———).

Der letzte Anreicherungsschritt ist in Abb. 10 gezeigt. Die Fraktionen 21-30 wurden gesammelt und mit 60 % Ammoniumsulfat gesättigt. Das ausgefallene Protein (90 %) wurde in einem mit 65 % Ammoniumsulfat gesättigten Citrat-Phosphatpuffer, pH 6,5, suspendiert und bei 4°C aufbewahrt. Gleich nach der Aufarbeitung zeigte die Pterindesaminase eine 23fache Anreicherung. Die Guanase dieser Präparation war auf das 38fache des Rohsaftes angestiegen.

Mit der Enzymsuspension sollten weitere Versuche unternommen werden. Es zeigte sich aber, daß das Enzym während der Lagerung nicht stabil ist und seine Pterindesaminaseaktivität verliert (Abb. 11).

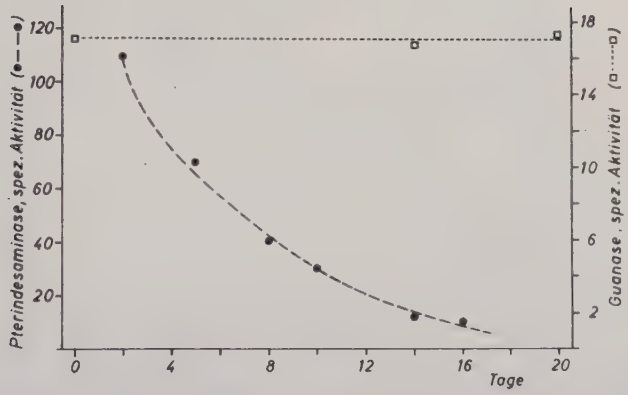


Abb. 11 Aktivitätsabnahme einer 23fach angereicherten und bei 4°C gelagerten Pterindesaminase. Guanase (.....), Pterindesaminase (-----).

Die Guanase bleibt dagegen über die ganze Zeit konstant. Sie ist folglich unter der oben geschilderten Aufbewahrungsbedingungen stabil. Trotz der großen Labilität der Pterindesaminase konnten während der ersten Zeit der Lagerung zwei Kurven erhalten werden. Die erste gibt die Zeitabhängigkeit der Desaminierung (Abb. 12)

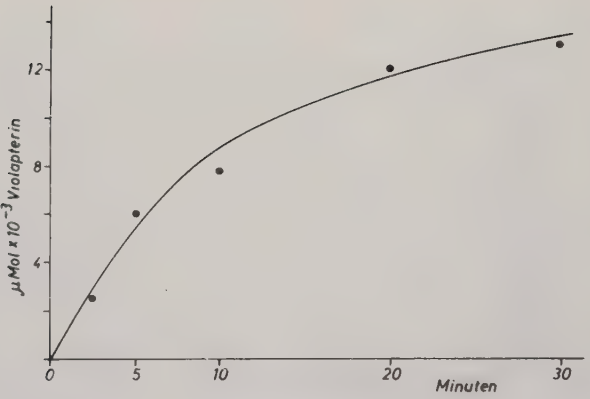


Abb. 12 Abhängigkeit der Desaminierung von der Inkubationszeit, 23fach angereichertes Enzym, 1 mg Protein, Testbedingungen wie unter 3.06.

Diese Kinetik führt zu dem gleichen Ergebnis, wie es mit einem weniger angereicherten Präparat (Abb. 4) erhalten wurde. Nach der Kurve sind 7 Minuten Inkubationszeit für einen Test geeignet. Eine Messung der Proteinabhängigkeit ergab mit sehr geringen Mengen Protein die erwartete lineare Abhängigkeit des Umsatzes (Abb. 13).

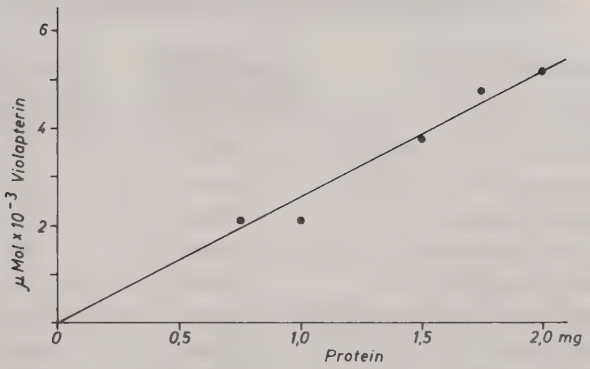


Abb. 13 Abhängigkeit der Desaminierung von der Proteinmenge. 23fach angereichertes Enzym, Testbedingungen wie unter 3.06, 9 Tage gelagert.

Ebenso zeigt eine grobe Berechnung aus einer Substratabhängigkeitskurve einen K_m-Wert für die Pterindesaminase, der in der schon gefundenen Größenordnung von 10^{-5} m liegt. Das Enzym hat sich also während der Anreicherung nicht verändert. Deshalb erscheint es als gerechtfertigt, in den folgenden Versuchen mit einer jeweils frisch dargestellten, nur 4-5fach angereicherten Enzympräparation zu arbeiten.

3.09 Einfluß von Zusätzen auf den Umsatz

Aequimolare Mengen Guanin haben keinen Einfluß auf die Umsatzrate, während die gleichen Mengen Azaguanin um 55 % hemmen. Ammoniumsulfationen in 10facher Konzentration, 2,4-Diaminopteridin und 2,4-Diamino-6-hydroxypyrimidin, ebenfalls in 10facher Menge zugegeben, beeinflussen die Reaktion nicht. Äquimolare Mengen Lumazin führen zu einer 55%igen Erniedrigung des Umsatzes.

Tabelle 6 Einfluß von Zusätzen auf die Aktivität der Pterindesaminase. Testbedingungen wie unter 3.06, DOP = 2,4-Diamino-6-hydroxypyrimidin.

Zusätze	Ausbeute/mg Protein mol x 10^{-3}	Hemmung/bzw. Steigerung des Umsatzes in %
Kein Zusatz	1,75	0
0,145 Mol Guanin	1,70	0
0,145 Mol Azaguanin	0,75	-55
1,45 Mol $(NH_4)_2SO_4$	1,75	0
1,45 Mol 2,4-Diaminopteridin	1,70	0
1,45 Mol DOP	1,70	0
0,145 Mol Lumazin	0,80	-55

3.10 Zur Reversibilität der Reaktion

Zum Studium der Reversibilität wurden Lumazin, bzw. katalytisch hydriertes Lumazin mit der doppelten Menge Ammoniumionen unter den üblichen Bedingungen 1 Stunde inkubiert. Eine Rückreaktion sollte sich durch entstandenes Isoxanthopterin zu erkennen geben. Bei der papierchromatographischen Auswertung der Versuche wurde kein Isoxanthopterin gefunden.

3.11 Hemmversuche

Die unspezifisch hemmenden CN-Ionen zeigen bei der untersuchten Reaktion eine gute Hemmwirkung, die nicht von der Konzentration des Hemmstoffes abhängig ist. Auch die Steigerung der Ausbeute bei Zusätzen von p-Cl-Mercuribenzoat ist von der Menge unabhängig. Bei der Guanase zeigt sich mit denselben Zusätzen kein Einfluß auf die Aktivität (Tabelle 7).

Tabelle 7 Einfluß von KCN und p-Cl-Mercuribenzoat(PCMB) auf die Desaminase- und Guanaseaktivität.

Zusätze	Ausbeute Violapterin in μ Mol x 10^{-3}	Guanase-einheiten/mg Protein/Min.
Kein Zusatz	1,75	4,5
5 x 10^{-4}m KCN	0,9	4,5
1 x 10^{-3}	1,0	4,5
5 x 10^{-3}	0,9	4,5
1 x 10^{-2}	1,0	4,5
1 x 10^{-4}m PCMB	2,1	4,5
5 x 10^{-4}	2,1	4,5
1 x 10^{-3}	2,3	4,5

3.12 Substratspezifität

Die in Tabelle 8 aufgeführten Pterine sowie DOP wurden als Substrate getestet. Da von den zu erwartenden Desaminierungsprodukten des Biopterins, 6-Hydroxymethylpterins und des Neopterins die Eigenschaften unbekannt sind, wurden die Ansätze nach der Reaktion mit alkalischem Permanganat oxydiert und papierchromatographisch auf Lumazin-6-Carbonsäure untersucht. Die Desaminierungsprodukte der anderen Stoffe sind leicht zugänglich und können ebenfalls papierchromatographisch mit den Produkten des Ansatzes verglichen werden.

Tabelle 8 Prüfung der Pterindesaminase auf Substratspezifität. Ansatzbedingungen wie unter 3.06, Inkubationsdauer 1 Stunde.
p = papierchromatographisch, r = radioaktiv.

Substrat	Nachweis als:	Nachweismethode	Ergebnis
Xanthopterin	6-Hydroxylumazin	p	-
Isoxanthopterin	Violapterin	p + r	+
6-Hydroxymethylpterin	6-Lumazincarbonsäure	p	-
Neopterin	6-Lumazincarbons.	p	-
Biopterin	6-Lumazincarbons.	p	-
Pterin-6-Carbonsäure	6-Lumazincarbons.	p	-
DOP	4-Aminouracil	p	-
Katalytisch hydriertes Pterin	Lumazin	p + r	+

Unter den gewählten Bedingungen werden nur Isoxanthopterin und katalytisch hydriertes Pterin desaminiert (Tabelle 8). Da beide Stoffe leicht aus (2-^{14}C)Pterin radioaktiv erhalten werden können, wurde das Ergebnis auch quantitativ ausgewertet. Isoxanthopterin liefert einen Umsatz von $0{,}9 \times 10^{-3}\,\mu$ Mol. Das ist etwas mehr als die halbe Umsatzrate des Standardansatzes. Katalytisch hydriertes Pterin wird dagegen viermal so gut wie Pterin desaminiert ($7{,}0 \times 10^{-3}\,\mu$ Mol).

3.13 Kriterien für die Existenz einer Pterindesaminase

Alle bisher beschriebenen Versuche haben hinreichendes Material geliefert, um eine Betrachtung über die Existenz einer spezifischen Pterindesaminase anzustellen. Aus den Rattenversuchen ergeben sich sechs Kriterien, die in der folgenden Tabelle zusammengestellt sind.

Tabelle 9 Kriterien für die Existenz einer spezifischen Pterindesaminase(2-Amino-4-hydroxypteridin-Aminohydrolase).

Kriterien	Pterindesaminase	Guanase
1. Stabilitätskurve (Abb. 11)	Aktivität nimmt in wenigen Tagen ab	Stabil während 20 Tagen
2. Verhältnis Guanase/ Pterindesaminase bei der Aufarbeitung	Anreicherung nach 5 Schritten 23fach	Anreicherung nach 5 Schritten 39fach
3. Hemmung durch KCN (Tab. 7)	wird um 45 % gehemmt	wird nicht gehemmt
4. Aktivierung durch PCMB (Tabelle 7)	35%ige Aktivierung	keine Aktivierung
5. Hemmung durch Azaguanin (Tabelle 6)	55%ige Hemmung	Azaguanin ist Substrat für Guanase
6. pH-Kurve (Abb. 6)	scharfes Maximum bei pH 6,5	flaches Maximum bei 9,2
7. Biene	Pterindesaminase von Guanase getrennt	
8. Kaninchen	keine Aktivität	Guanasetest positiv
9. Huhn	keine Aktivität	Guanasetest positiv

4. Diskussion

Die Existenz einer relativ unspezifischen Pterindesaminase wurde von Hayaishi (1) und von McNutt (2) bei einem Alcaligenesstamm, also einem Mikroorganismus, bewiesen. In Enzympräparationen aus Kaninchen- und Hühnerleber konnte keine Pterindesaminase nachgewiesen werden, während Guanase gemessen wurde. Da jedoch längere Zeit gelagerte Präparate untersucht wurden, läßt sich nicht ausschließen, daß ein ursprünglich vorhanden gewesenes Enzym inaktiviert wurde. Bei Bienenlarven konnten dagegen Pterindesaminase und Guanase nachgewiesen und getrennt werden. Große Schwierigkeit bereitete bei der vorliegenden Arbeit der Beweis, daß bei der Ratte die Desaminierung von Pterin nicht von der Guanase katalysiert wird, denn bei der Aufarbeitung von Rattenleber fällt mit Ammoniumsulfat die Pterindesaminase mit der Guanase in der selben Fraktion. Während der weiteren Reinigung wird aber immer ein unkonstantes Verhältnis von Guanase-zu Pterindesaminase-Aktivität gefunden; darin liegt ein wichtiger Hinweis auf das Vorkommen von zwei verschiedenen Enzymen. Besonders eindeutig verliefen Trennungsversuche mit kleinen Proteinmengen auf Sephadex G-100, in denen eine Pterindesaminaseaktivität vollständig von der der Guanase abgetrennt werden konnte. Der Guanasegipfel enthielt jedoch eine höhere Pterindesaminaseaktivität als die abgetrennte Pterindesaminase. Das könnte bedeuten, daß Guanase auch Pterin zu desaminieren vermag. Bei der Ähnlichkeit der Struktur von Guanin und Pterin ist das denkbar, da nur der Pyrimidinring primär an der Reaktion beteiligt ist und dieser bei beiden Stoffen gleich substituiert ist. Dagegen spricht aber die hohe Spezifität der Guanase (20).

Bei Verwendung größerer Substanzmengen konnte eine Trennung der beiden Enzyme nicht erreicht werden. Das mag an einem nicht optimal gewählten Volumen der Trennungssäule gelegen haben. Es wurden aber weitere Befunde erbracht, die eine Existenz der Pterindesaminase neben Guanase sehr wahrscheinlich machen. Haldane (22) und Dixon (23) geben eine Reihe von Kriterien an, die das Vorliegen zweier Enzyme in einer Präparation beweisen, wenn diese dieselbe Reaktion katalysieren. Auf das hier gestellte Problem angewendet, findet man hinreichende Beweise für die Existenz der Pterindesaminase:

1. Die Stabilität des 23fach angereicherten Enzyms ist bei der Lagerung sehr gering. Schon nach 14 Tagen war die Aktivität um 90% gesunken. Im Gegensatz dazu blieb die Guanase über einen Zeitraum von 20 Tagen stabil.

2. Das schon erwähnte Verhältnis von Guanase zu Pterindesaminase ist bei keinem Aufarbeitungsschritt konstant, was bei einer Identität beider Enzyme zu fordern ist.

3. Azaguanin hemmt die Desaminierungsreaktion um 55%, während Guanin keinen Einfluß auf den Umsatz hat. Wenn die Guanase mit der Pterindesaminase identisch wäre, müßte wegen der um fast zwei Zehnerpotenzen verschiedenen K_m-Werte Guanin ein besseres Substrat sein als Pterin, die Ausbeute also abnehmen. Der K_m-Wert der Guanase ist für Guanin als Substrat 5×10^{-6} m, für Azaguanin 7×10^{-5} m (24). Nach diesen Werten sollte Guanin sogar besser hemmen als Azaguanin.

4. Die auch unspezifisch hemmenden CN-Ionen erniedrigen den Umsatz um 45%, die Guanase wird nicht beeinflußt.

5. Bei Zusatz von PCMB wird für die Pterindesaminase eine Umsatzsteigerung von 35% gemessen, während die Guanase nicht beeinflußt wird. Den gleichen Wert findet Metzger (25) für den Abbau von Tetrahydrobiopterin zu 6-Hydroxylumazin.

6. Das pH-Maximum liegt für die Pterindesaminase um 2,5 pH-Einheiten weiter im sauren Bereich als für die Guanase. Dieser Befund ist allerdings nicht sehr stichhaltig, da besonders bei ionisierbaren Molekülen, wie es das Pterin ist, die Affinität zum Enzym verändert sein und dadurch ein neues Maximum für die Reaktion auftreten kann.

Diese Kriterien sprechen zusammen mit dem schon beschriebenen Vorkommen bzw. Fehlen der Pterindesaminase in anderen Organismen für die Existenz des Enzyms auch in Rattenlebern. Im Unterschied zu der von Hayaishi isolierten Pterindesaminase ist die Spezifität des hier untersuchten Enzyms sehr hoch. Außer Pterin wird nur Isoxanthopterin desaminiert. Auffallend ist die viermal so hohe Desaminierungsrate beim hydrierten Pterin. Es ist denkbar, daß Pterin in seiner hydrierten Form das eigentliche Substrat für das Enzym darstellt. Dafür spricht der hohe K_m-Wert von 3×10^{-5} m, wenn nicht hydriertes Pterin als Substrat verwendet wird. Wie neuere Untersuchungen zeigen (26), sind hydrierte Pterine die eigentlich aktiven Stoffe im biologischen Geschehen. Metzger (4) und Gutensohn (27) finden bei der Inkubation von Tetrahydrobiopterin bzw. Tetrahydroneopterin in hohen Ausbeuten 6-Hydroxylumazin. Biopterin, Neopterin und 6-Hydroxymethylpterin werden nicht umgesetzt.

Als biologische Funktion der Pterindesaminase wäre eine Beteiligung an der Biosynthese der Pterine aus Lumazinen denkbar, wie es Hayaishi (1), Forrest (10) und andere diskutieren. Dagegen sprechen allerdings die Ergebnisse von Versuchen zur Reversibilität der Desaminierungsreaktion. Tetrahydrobiopterin ist u.a. ein wichtiger Cofaktor bei der Hydroxylierung aromatischer Aminosäuren. Die Pterindesaminase könnte eine regulatorische Funktion bei der Umwandlung von Tetrahydrobiopterin in 6-Hydroxylumazin ausüben. Ein konstanter Tetrahydrobiopterinspiegel ließe sich einerseits

durch enzymatische Reduktion von Dihydrobiopterin, andererseits durch Abbau des vollständig hydrierten Cofaktors zu 6-Hydroxylumazin einstellen. Das erstmals in Bienen und Ratten nachgewiesene Enzym könnte damit eine wichtige Funktion im Stoffwechselgeschehen erfüllen.

5. Zusammenfassung

Bienenpuppen besitzen eine Pterindesaminaseaktivität, die in 4tägigen Larven am höchsten ist. Durch Ammoniumsulfatfällung kann das Enzym von der Guanase abgetrennt werden.

Rattenlebern besitzen eine 5-8fach höhere Pterindesaminaseaktivität als Bienenpuppen. Bei der Anreicherung des Enzyms aus Rattenleber fällt seine Aktivität in dieselbe Ammoniumsulfatfraktion wie die der Guanase. Durch anschließende Hitzebehandlung bei 60°C, Reinigung über eine Sephadex G-100 Säule und Rechromatographie (3 Umläufe) in einer Recychromapparatur wird eine 23fach angereicherte Pterindesaminasepräparation erhalten. Die Guanaseaktivität wird dabei 39fach angereichert.

Es werden Kriterien für die Verschiedenheit von Guanase und Pterindesaminase erarbeitet. Diese sind: Unterschiede im Verhältnis der Aktivitäten während der Aufarbeitung, Stabilitätsunterschiede bei der Lagerung des Enzyms, Hemmung durch CN-Ionen, Hemmungsunterschiede bei Azaguanin- bzw. Guaninzugabe, Unterschiede im pH-Maximum der Reaktion mit Guanin und Pterin, Unterschiede der Enzymaktivität in verschiedenen Organismen.

Der K_m-Wert des erstmals nachgewiesenen Enzyms (5fache Anreicherung) ist 3×10^{-5}(m). Das pH-Maximum der Reaktion liegt bei 6,5. Das Enzym desaminiert spezifisch Pterin, Isoxanthopterin und hydriertes Pterin. Xanthopterin, Biopterin, Neopterin, Pterin-6-Carbonsäure und 6-Hydroxymethylpterin werden nicht desaminiert.

6. Experimenteller Teil

Darstellung und Reinigung von Pterin, 6-Hydroxymethylpterin, 2-Amino-4-hydroxy-6-(1,2,3-trihydroxypropyl)pteridin sowie Radiosynthese dieser Stoffe:

2,4,5-Triamino-6-hydroxypyrimidin wurde nach C.K. Cain (11) hergestellt.

(2-^{14}C)2,4,5-Triamino-6-hydroxypyrimidin wurde nach einer Vorschrift aus Houben-Weyl dargestellt. Spezifische Aktivität = 1 mC/mMol. (28).

Pterin wurde nach C.K. Cain et.al. (11) dargestellt.

(2-^{14}C)Pterin wurde nach derselben Methode durch Kondensation von (2-^{14}C)TOP-Sulfat synthetisiert. Spezifische Aktivität = 1 mC/mMol.

6-L-erythro(1,2,3-trihydroxypropyl)-pterin wurde nach einer Vorschrift von H. Rembold und H. Metzger dargestellt (12).

(2-^{14}C)6-L-erythro(1,2,3-trihydroxypropyl)-pterin wurde nach derselben Methode durch Kondensation von (2-^{14}C)TOP-Sulfat mit Arabinose hergestellt.

6-Hydroxymethylpterin wurde durch Kondensation von TOP-Sulfat mit Glycerinaldehyd synthetisiert. Die Reaktionsbedingungen dieser Synthese waren im Sinne der Methode von H. Rembold und H. Metzger (12).

(2-^{14}C)6-Hydroxymethylpterin wurde auf dem gleichen Wege wie oben durch Kondensation von (2-^{14}C)TOP-Sulfat mit Glycerinaldehyd dargestellt.

(2-^{14}C)Isoxanthopterin wurde enzymatisch durch Behandlung von (2-^{14}C)Pterin mit Xanthinoxydase erhalten.

Die gewonnenen Pterine wurden nach der Synthese auf P-Cellulosesäulen nach der Vorschrift von H. Rembold und H. Metzger gereinigt (12).

Hydrierung von Pterin und Lumazin

Die Hydrierung erfolgte nach der Methode von H. Rembold und H. Metzger (29) in der dort beschriebenen Apparatur.

Verwendete Ionenaustauscher

Bei der Darstellung von Pterinen und bei der Analyse der Inkubationsansätze wurden folgende Austauschmaterialien verwendet:

Dowex 1X8, von der Firma Dow Chemical Company hergestellt, ist ein starker Anionenaustauscher, 200-400 mesh, Gegenion Cl'.

Ecteola-Cellulose (Serva). Der Austauscher ist ein schwacher Anionenaustauscher, dessen Konstitution nicht genau bekannt ist.

Phosphor-Cellulose (Serva) ist ein schwacher Kationenaustauscher.

Sephadex G-25 Coarse und Sephadex G-100 (Pharmacia, Uppsala) wurden bei der Trennung und Reinigung der Enzyme verwendet.

Die Cellulosesäulen wurden nach der Methode von H. Rembold und H. Metzger (12) für die Trennung präpariert.

Papierchromatographische Trennungen

Die Trennungen erfolgten aufsteigend auf Papierstreifen der Firma Schleicher & Schüll, Papiersorte 2043 b. Als Systeme fanden Verwendung:

a : Butanol / Eisessig / Wasser (20:3:7)
b : 3%ige wässrige Ammoniumchloridlösung
c : 4%ige wässrige Natriumcitratlösung
d : Propanol / 1%iger wässriger Ammoniak (2:1)

Die Pterine können durch Bestrahlen mit einer UV-Lampe (Hanau) auf dem Papier als blau bis violette Flecken erkannt werden. Ebenso die Lumazine.

Die präparative Chromatographie wurde absteigend auf der Papiersorte 2043 b (Schleicher & Schüll) durchgeführt.

Experimentelles zu den Bienenversuchen

Die verschiedenen Entwicklungsstadien der Bienen apis mellifica wurden kurz vor dem Versuch aus einer Wabe herauspräpariert+) und sofort in einem 4°C kalten, 0,1 m Citrat-Phosphatpuffer pH 6,4, homogenisiert. Zu den Homogenaten wird (2-^{14}C)Pterin gegeben und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird durch Hitzedenaturierung gestoppt. Vom ausgefallenen Protein wird in einer Tischzentrifuge (Christ) abzentrifugiert und der Überstand auf einer 5 ml großen Ecteola-Säule chromatographiert. Es werden Fraktionen zu 12 ml aufgefangen. Aus den wässrigen und sauren Fraktionen wird jeweils ein Aliquot von 0,5 ml auf ein Al-Plättchen pipettiert und in einem Zähler die Radioaktivität bestimmt. Die saure, radioaktive Fraktion wird papierchromatographisch in allen vier Systemen untersucht und als Violapterin identifiziert. Als Kontrollwert dient bei jedem Entwicklungsstadium eine Probe, die vor Zugabe des Substrats kräftig aufgekocht wird.

+) Fräulein Dr. G. Hanser danke ich für die Überlassung der verschiedenen Entwicklungsstadien der Bienen.

Für die Ansätze wurden verwendet:

85 Stück 2tägige Larven (1 g Frischgewicht),
30 Stück 4tägige Larven (4 g Frischgewicht),
15 Stück 6tägige Larven (1,9 g Frischgewicht),
15 Stück Bienenpuppen (2 g Frischgewicht),
30 Stück Imagines (1 Tag geschlüpft).

Für die Ammoniumsulfatfraktionierung wurde das Homogenat von 100 4tägigen Larven 20 Minuten bei 38 000 x g zentrifugiert und zum Überstand langsam unter Rühren festes Ammoniumsulfat gegeben. Bei der gewünschten Sättigung wurde das ausgefallene Protein abzentrifugiert und in 0,01 m Citrat-Phosphatpuffer, pH 7,0 gelöst. Die erhaltene Proteinlösung wurde mit (2-^{14}C)Pterin 1 Stunde bei 37°C inkubiert, und danach wurde wie oben der Ansatz ausgewertet. Alle Arbeiten wurden bei 4°C ausgeführt.

Rattenversuche, Ansatz und Analyse der Ansätze.

Das Protein der jeweiligen Reinigungsstufe wird in dem benötigten Puffer die gewünschte Zeitdauer bei 37°C in einem Schüttelinkubator mit der erforderlichen Menge Pterin oder anderen Zusätzen aerob inkubiert. Die Reaktion wird durch schnelles Aufkochen über einem Bunsenbrenner gestoppt. Vom ausgefallenen Protein wird in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert und der Überstand auf 3-5 ml große Ecteola-Cellulosesäulen aufgetragen. Es werden die neutralen Stoffe mit Wasser eluiert und dabei die ersten 84 ml in 7 12ml-Fraktionen aufgefangen. Danach werden noch 150 ml Wasser durch die Säule gespült, wobei die Tropfgeschwindigkeit beliebig groß sein kann. Anschließend wird mit 5%iger Ameisensäure eluiert. 2-3 ml Fraktionen werden aufgefangen. In der wässrigen Zone wird die Radioaktivität durch Plattieren von 0,5 ml Aliquoten und anschließendem Auswerten in einem Zählgerät bestimmt. Von den sauren Fraktionen werden Aliquote

von 0,75 ml gezählt. Die prozentuale Ausbeute des Umsatzes berechnet sich aus dem Verhältnis von gezählter Gesamtaktivität zur Aktivität im sauren Bereich.

Gewinnung der Zellbestandteile

Die Zellbestandteile wurden nach der bei G.H. Hogeboom (30) beschriebenen Methode gewonnen.

Ammoniumsulfatfällung

Alle Arbeiten wurden bei 4°C ausgeführt.

Der Überstand des Leberhomogenats, der durch 1stündiges Zentrifugieren bei 23 000 x g erhalten wird, wird unter Rühren langsam mit festem Ammoniumsulfat versetzt. Nachdem die Zugabe beendet ist, die ungefähr 10-20 Minuten dauert, wird noch 45 Minuten gerührt. Danach wird die Proteinsuspension 15 Minuten bei 12 000 rpm zentrifugiert, und der erhaltene Überstand je nach Bedarf mit weiterem Ammoniumsulfat versetzt, bis die geforderte Proteinfraktion erhalten wird. Diese wird in der ca. 80fachen Menge eines 0,1 m Citrat-Phosphatpuffers, pH 6,5 durch langsames Rühren gelöst.

Dialyse bei 4°C

Die bei der Ammoniumsulfatfällung gewonnene Lösung wird 10-16 Stunden gegen 10 Liter 0,001 m Citrat-Phosphatpuffer, pH 6,5 dialysiert. Vom ausgefallenen Protein wird nicht abzentrifugiert.

Hitzebehandlung

Die trübe Proteinlösung wird nach der Dialyse 5 Minuten bei 60°C gehalten. Dabei wird langsam mit einem Glasstab gerührt. Anschließend wird die Suspension sofort in einem Eisbad gekühlt. Vom ausgefallenen Protein wird durch Zentrifugation bei 18 000 rpm, 15 Minuten, eine klare Lösung abgetrennt.

Sephadex-Chromatographie

Die nach der Hitzebehandlung erhaltene klare Proteinlösung wird auf eine 250 ml Sephadex G-100-Säule mit einer Pumpe aufgetragen. Das Sephadexgel wird mit entlüftetem 0,01 m Citrat-Phosphatpuffer, pH 6,5 in die Säule eingeschlämmt. Mit diesem Puffer wird das Protein auch eluiert. Ein Uvicord II (LKB) mit angeschlossenem Schreiber registriert die Extinktion bei 280 mμ. Bei der Umlaufmethode wird das Protein beim Verlassen der Säule vorerst nicht in einem Fraktionsammler gesammelt, sondern ohne Unterbrechung der Chromatographie wieder automatisch auf die Säule aufgetragen. Nach 3maligem Umlauf wird ein an der Apparatur befindlicher Hahn geöffnet und die Proteinlösung in einem Fraktionssammler aufgefangen. Die Fraktionen sind 5 ml groß. Die Tropfgeschwindigkeit ist 20 ml/Stunde. Die Chromatographie wird bei 4°C durchgeführt. Es wurde ein Re-Cy-Chrom-Gerät (LKB) mit zwei 250 ml Säulen (Ø 3,4 cm, Länge 90 cm) verwendet.

Aufarbeitung von 30 Rattenlebern

Ausführung bei 4°C.

30 Ratten, weiblich, Whistar, 3-4 Monate alt, ergaben 370 g Leber. Diese wurden in einer 5fachen Menge 0,1 m Citrat-Phosphatpuffer, pH 6,5 mit einem Homogenisator nach Potter-Elvehjem (31) (Firma Braun, Melsungen) homogenisiert. Das Homogenat wird eine Stunde bei 12 000 rpm im Rotor 69179 einer MSE-Kühlzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wird wie oben beschrieben mit Ammoniumsulfat auf 50 % Sättigung gebracht. Vom ausgefallenen Protein wird während 15 Minuten bei 12 000 rpm abzentrifugiert, und die Lösung darauf wie oben auf 60 % Sättigung eingestellt. Wieder wird wie oben das ausgefallene Protein abzentrifugiert. Nach Lösen des Proteins in 0,1 m Citrat-Phosphatpuffer pH 6,5 werden 260 ml Proteinlösung erhalten. Diese wird anschließend

16 Stunden gegen 10 Liter 0,001 m Citrat-Phosphatpuffer, pH 6,5 dialysiert. Die Proteinsuspension wird 5 Minuten bei 60°C gehalten und danach das ausgefallene Protein durch Zentrifugation entfernt. Die erhaltenen 300 ml klare Proteinlösung werden auf 1/6 des Volumens in einem Rotationsverdampfer (Büchi) bei Zimmertemperatur eingeengt. Diese Lösung wird dann über Sephadex G-100 wie oben beschrieben weiter gereinigt.

Guanasetest

Die Guanase wird nach der Methode von Kalkar (15) getestet.

Bestimmung der Radioaktivität

Die Radioaktivitäten wurden in einem Omni-Guard, Low level background counting system (Tracerlab), Nulleffekt: 1 Ipm, gemessen.

Xanthinoxydase

Die Xanthinoxydase (XOD) wurde von der Firma Boehringer, Tutzing bezogen.

Spezielles

Absorptionsmessungen wurden mit Hilfe eines UV-Spektrophotometers PMQ II (ZEISS) durchgeführt. An weiteren wichtigen Geräten fand Verwendung:

Schüttelinkubator, Fraktionssammler, Rotationsverdampfer, Perforatoren, Zentrifugen: Automatic-Servall-Superspeed, Beckman Spinco, Modell L2.

Literaturverzeichnis

1. B.Levenberg und O.Hayaishi, J.biol.Chemistry 234,955 (59).
2. W.S.McNutt, J.biol.Chemistry 238,1116 (63).
3. L.Buschmann, Dissertation Universität München (63).
4. H.Rembold und H.Metzger, Z.klin.Chem. 3, 208 (65).
5. G.M.Brown und J.J.Reynolds, J.biol.Chemistry 239, 317 (64).
6. F.Weygand, H.Simon, G.Dahms, M.Waldschmidt, H.J.Schliep und H.Wacker, Angew.Chem. 73, 402 (61).
7. G.W.E.Plaut, J.biol.Chemistry, PC 41 (60).
8. F.W.Goodwin und A.A.Horton, Nature(London) 191, 772 (61).
9. T.Masuda, S.Kuwada, T.Kishi und M.Asai, Chem.pharmac.Bull. (Tokyo) 6, 618 (58).
10. H.S.Forrest, J.Amer.chem.Soc. 80, 739 (58).
11. C.K.Caine, M.F.Mallette und E.C.Taylor, J.Amer.chem.Soc. 68, 1996 (46).
12. H.Rembold und H.Metzger, Chem.Ber. 96, 1395 (65).
13. W.Pfleiderer, Chem.Ber. 94, 1 (61).
14. H.Rembold und L.Buschmann, Liebigs Ann.Chem. 662, 72 (63).
15. H.M.Kalkar, J.biol.Chemistry 167, 461 (47).
16. R.J.Doisy, D.A.Richert und W.W.Westerfield, J.biol.Chemistry 217, 307 (55).
17. H.M.Kalkar und H.Klenow, J.biol.Chemistry 174, 771 (48).
18. A.Roush und E.R.Norris, Arch.Biochem.Biophys. 29, 344 (50).
19. L.Shuster, Methods in Enzymology II (Academic Press N.Y. 1955) S. 480.
20. M.Mansor, G.D.Kalyankar und G.P.Talwar, Biochim.biophysica Acta (Amsterdam) 77, 307 (55).
21. H.Lineweaver und D.Burk, J.Amer.chem.Soc. 56, 658 (34).
22. J.B.S.Haldane, Enzymes (London, Longmanns 1930).
23. M.Dixon, Enzymologia 5, 198 (38).

24. A.Roush und E.R.Norris,	Arch.Biochem.Biophysics 29, 124 (50).
25. H.Metzger,	Dissertation Universität München (1965).
26. S.Kaufmann,	J.biol.Chemistry 236, 804 (64).
27. W.Gutensohn,	unveröffentlicht.
28. Houben-Weyl,	Methoden der organischen Chemie, 4.Auflage, Band II, S. 671 (Georg Thieme Verlag, Stuttgart).
29. H.Rembold und H.Metzger,	Hoppe-Seyler's Z.Physiol. Chem. 148, 194 (67).
30. G.H.Hogeboom,	Methods in Enzymology I (Academic Press N.Y. 1955) S. 16.
31. V.R.Potter und C.A.Elvehjem,	J.biol.Chemistry 114, 495 (36).

Lebenslauf

Am 25. Juli 1937 wurde ich als Sohn des Offiziers Otto Simmersbach und seiner Frau Hiltrud, geborene Steinke, in Erfurt/Thüringen geboren. Die Volksschule besuchte ich während des Krieges in Breslau und Tillendorf/Schlesien, nach der Flucht in die Ostzone in Schwerin/Mecklenburg, später in Bayrischzell und Kempten.

1948 trat ich in das private Realgymnasium des Landerziehungsheims Neubeuern/Inn ein, und dort erhielt ich 1957 mein Reifezeugnis.

Im November 1957 begann ich mit dem Studium der Chemie an der Ludwig-Maximilian-Universität München. Im Sommer 1960 legte ich dort die Diplomvorprüfung ab, im Mai 1963 die Diplomhauptprüfung.

Im Juni 1963 begann ich mit der Diplom- und Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Biochemie unter der Leitung von Professor Dr. A. Butenandt und Privatdozent Dr. H. Rembold, mit der ich bis März 1967 beschäftigt war.